

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: BBI



Lucie Křenková

Stresové odpovědi kmenů rodu *Rhodococcus*
Stress responses in *Rhodococcus* strains

Bakalářská práce

Školitel: Ing. Miroslav Pátek, CSc.

Praha, 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 1. 6. 2020

Podpis

Mé upřímné poděkování patří Ing. Pátkovi, CSc. za jeho odborné vedení, trpělivost, rychlou komunikaci a množství cenných rad, které mi nesmírně pomohly při psaní této bakalářské práce.

Obsah

Seznam použitých zkratek	v
Abstrakt	vi
1. Úvod	1
2. Environmentální stres	2
2.1 Chladový stres.....	2
2.2 Teplotní stres	4
2.3 Osmotický stres.....	5
2.4 Vysychání	7
2.5 pH stres.....	9
3. Stres při degradacích toxických sloučenin.....	11
3.1 Fenoly.....	11
3.2 Monocyklické aromatické uhlovodíky	12
3.3 Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU).....	13
3.4 Polychlorované bifenyly (PCB).....	14
5. Závěr	16
Literatura.....	17

Seznam použitých zkratek

ATP	adenosintrifosfát	adenosine triphosphate
Bph	bifenyly	biphenyl
BTEX	benzen – toluen – ethylbenzen – xylén	benzene – toluene – ethylbenzene – xylene
Co-A	koenzym A	coenzyme A
COG	genové shluky	cluster of genes
ECF	rodina sigma faktorů s extracytoplazmatickou funkcí	extracytoplasmic function family sigma factors
EPS	extracelulární polysacharidy	extracellular polysaccharides
Etb	ethylbenzen	ethylbenzene
MFS	superrodina hlavních sekundárních přenašečů	major facilitator superfamily
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina	messenger ribonucleic acid
PAAT family	rodina transportérů vychytávajících polární aminokyseliny	polar amino acid uptake transporter family
PAU	polyaromatické uhlovodíky	polyaromatic hydrocarbons
PCB	polychlorované bifenyly	polychlorinated biphenyls
pre-mRNA	prekurzorová mediátorová RNA	messenger RNA precursor
<i>R.</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Rhodococcus</i>
RNAP	polymeráza ribonukleové kyseliny	ribonucleic acid polymerase
ROS	reaktivní formy kyslíku	reactive oxygen species
sp.	druh	species
TAG	triacylglycerol	triacylglycerol
THF	tetrahydrofuran	tetrahydrofuran
VBNC	živé ale nekultivovatelné buňky	viable but non-culturable cells

Abstrakt

Bakterie si během evoluce vyvinuly důmyslné mechanismy, které jim umožňují přežívat a růst v nehostinných podmínkách s extrémními hodnotami teploty, vodní a osmotické aktivity a pH. Bakterie rodu *Rhodococcus* jsou ve schopnosti přizpůsobit se takovýmto extrémům natolik efektivní, že jsou schopny růst i v přítomnosti toxických sloučenin, čímž mezi bakteriemi vynikají. Jejich velký genom ukrývá velké množství genů využitelných v široké škále katabolických drah. Využitelnost v biotechnologiích je podmíněna znalostí mechanismů stresových odpovědí. Kmeny rhodokoků na stresové podmínky reagují změnou exprese genů pomocí transkripčních regulátorů, dvousložkových systémů a sigma faktorů RNA polymerázy. Základním modelem odpovědi na stresové podmínky je zvýšení exprese chaperonů, chaperoninů a proteáz, které opravují či degradují poškozené proteiny. Většina stresových odpovědí je velmi komplexních a překrývají se také skupiny genů, které na ně reagují. Interpretace výsledků studií na toto téma je tedy velmi náročný, avšak pro optimalizaci využití v biotechnologiích naprosto nezbytný proces.

Klíčová slova: stresové odpovědi, bakterie, *Rhodococcus*, biotechnologie, degradace, toxické sloučeniny, sigma faktor

Abstract

Throughout the evolution, bacteria developed ingenious mechanisms which help them survive and grow in harsh conditions, where extreme temperatures, pH, changing water and osmotic activity occurs. *Rhodococcus* sp. cope with these conditions so efficiently they are able to grow in the presence of toxic compounds. Large genome of *Rhodococcus* sp. consists of a great amount of genes involved in a broad spectre of catabolic pathways. To use these skills in biotechnology, it is necessary to know stress response mechanisms well. In response to the changing environment *Rhodococcus* sp. use transcriptional regulators, two-component system and RNA polymerase sigma factors to tune the expression profiles of the genes. The upregulation of chaperons, chaperonins and proteases is the main pattern followed in most of the stress responses. Vast majority of stress responses is complex and groups of genes to react on them interfere too. Thus, it is very difficult to interpret the data of these studies. However, the great importance of understanding these mechanisms is unquestionable.

Key words: stress response, bacteria, *Rhodococcus*, biotechnology, degradation, toxic compounds, sigma factor

1. Úvod

Všechny organismy na planetě jsou neustále vystavovány nejružnějším stresorům z okolního prostředí, např. vysoká teplota, chlad, neoptimální pH, přítomnost toxických látek. Vlivem těchto stresorů organismus spouští obranné mechanismy k zachování vnitřní rovnováhy.

Mikroorganismy se od ostatních organismů v efektivitě zvládání stresových podmínek značně liší. Většina mikroorganismů je schopna adaptace na mírnější změny podmínek v řádu minut, či hodin (Hill et al., 1995). Odpověď na stres u mikroorganismů zahrnuje změny v genové expresi. U bakterií dochází k regulaci transkripce především prostřednictvím transkripčních regulátorů, dvousložkových systémů a sigma faktorů RNA polymerázy.

V adaptaci na rozličné stresové podmínky mezi mikroorganismy vynikají aktinomycety rodu *Rhodococcus*. Jejich přítomnost byla zjištěna v půdě, horninách, mořských sedimentech, zvířecím hnoji i uvnitř živočichů a rostlin (nemocných i zdravých) (Bell et al., 1998). Podařilo se je izolovat také z mnoha extrémních stanovišť – např. z ropných rezervoárů v Brazílii (De Oliveira et al., 2008), z pouštní půdy v Saudské Arábii (Röttig et al., 2016), či vysokohorských jezer v Andách (Belfiore et al., 2018).

Rhodococcus je rod aerobních, grampozitivních a nepohyblivých bakterií (Warhurst & Fewson, 1994). Disponují velkým množstvím enzymů schopných degradovat například krátké i dlouhé řetězce alkanů, aromatické sloučeniny, heterocykly a polycyklické aromatické sloučeniny (Larkin et al., 2005). Jsou tedy velmi vhodnými kandidáty pro bioremediaci, biodegradaci a biotransformaci (Bell et al., 1998).

Jejich praktické využití je podmíněno dalším výzkumem – především mechanismů, jakými se bakterie vypořádávají se stresovými podmínkami. Většina dosavadních prací se věnuje spíše jejich využití k degradacím, bez hlubší znalosti mechanismů stresových odpovědí, které často s degradacemi přímo souvisí. Stresové odpovědi jsou zpravidla velmi komplexního rázu, čímž je jejich bližší studium značně ztíženo.

Cílem této práce je především shrnout dosavadní poznatky v mechanismech stresových odpovědí rodu *Rhodococcus* (vyjma patogenních druhů). Popsány jsou odpovědi na stres environmentální (teplotní, chladový, osmotický, pH, vysychání) a stres při degradacích toxických sloučenin (např. fenoly, monocyklické a polycyklické aromatické uhlovodíky). Vzhledem k velkému rozsahu publikovaných prací se zde mohou věnovat pouze příkladům, které dobře vystihují stav poznání této problematiky.

2. Environmentální stres

2.1 Chladový stres

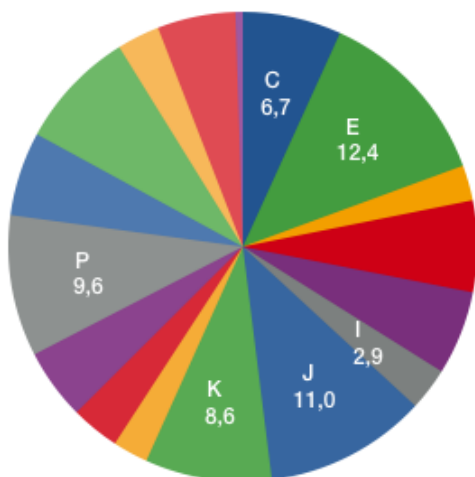
Více než 80 % biosféry Země zaujímají trvale chladné oblasti, kde teplota nepřesahuje 5 °C. Je to dáno tím, že většina zemského povrchu je tvořena hlubokými oceány a dvě třetiny z nich mají stálou teplotu okolo 2 °C (Russell, 1990). Se stresem způsobeným nízkou (suboptimální) teplotou se tedy mikroorganismy setkávají nejčastěji.

V kryogenním prostředí se musejí mikroorganismy vypořádat se sníženou fluiditou membrány, sníženou reakční rychlostí, menší rychlostí difúze, špatným sbalením proteinů a nízkou enzymovou aktivitou (Bakermans et al., 2014; Raymond-Bouchard et al., 2018). Zároveň s chladem je v těchto oblastech nízká dostupnost živin a vody. V permafrostu nebo ledu se voda v kapalném skupenství vyskytuje pouze v kanálcích, ve kterých vysoká koncentrace solí zabraňuje jejímu zamrznutí. Z toho plyne také nutnost překonávání osmotického stresu a vysokých koncentrací solí (Gilichinsky et al., 2005).

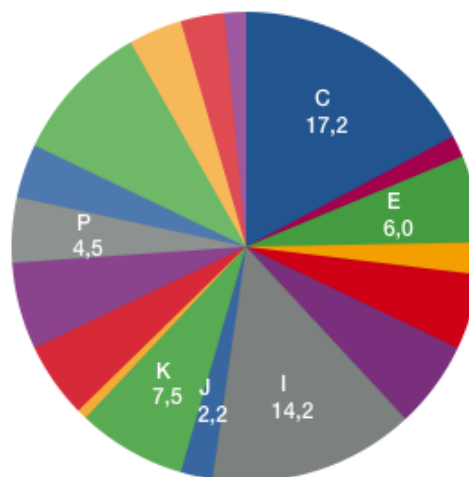
U psychrofilního kmene *Rhodococcus* sp. JG3 izolovaného z nejchladnějšího a nejsuššího permafrostu na Zemi (z Antarctic McMurdo Dry Valley) bylo (ve srovnání s mezofilními příbuznými) v genomu detekováno množství kódujících sekvencí pro proteiny, které jsou typické pro chladový a osmotický stres, proteiny chladového šoku a proteiny pro modifikaci buněčné stěny (Goordial et al., 2016). Psychrofilní kmen JG3 rostoucí v -5 °C vykazuje ve srovnání s kmenem rostoucím v 25 °C zvýšenou četnost transkriptů translačních a ribozomálních proteinů. Dochází také ke zvýšení aktivity metabolismu a transportu aminokyselin i anorganických iontů. Naopak transkripty, které se účastní transportu a metabolismu lipidů a produkce a přeměny energie, vykazují sníženou hladinu (viz Obr.1) (Raymond-Bouchard et al., 2018).

Při nízkých teplotách se na regulaci transkripce a translace vazbou na DNA či RNA podílejí proteiny chladového šoku (*cold shock proteins*). V kmeni JG3 bylo detekováno 5 proteinů chladového šoku, z nichž dva byly zařazeny jako CspA a jeden jako CspC (Goordial et al., 2016). U *Rhodococcus* sp. není mechanismus jejich účinku zatím vysvětlen. U *Escherichia coli* je hlavním proteinem chladového šoku právě CspA. Tento protein působí jako RNA chaperon – váže se na sekundární struktury RNA a ovlivňuje jejich sbalení. Předpokládá se, že právě tato vlastnost CspA umožňuje účinnou translaci mRNA při nízkých teplotách (Jiang et al., 1997). Správné sbalení (*folding*) a funkčnost exprimovaných proteinů pak zajišťují chaperony DnaJ, DnaK, ClpB a GrpE (Goordial et al., 2016).

Zvýšená exprese při -5 °C (%)



Snížená exprese při -5 °C (%)



Obr. 1: Diagram vybraných kategorií genů (COG) s výraznou mírou (2x a více) odlišné exprese u *Rhodococcus* sp. JG3 rostoucího v -5 °C ve srovnání s růstem při 25 °C. Písmena v diagramu odpovídají kategoriím COG: C – produkce a konverze energie; E – metabolismus a transport aminokyselin; I – metabolismus a transport lipidů; J – translace, struktura ribozomů, biogeneze; K – transkripce; P – metabolismus a transport anorganických iontů. Hodnota udává velikost skupiny genů v % (Raymond-Bouchard et al., 2018, upraveno)

Se snižující se teplotou se nápadně zvyšuje rigidita plazmatické membrány. Jelikož jsou v její fosfolipidové vrstvě zakotveny některé proteiny dýchacího řetězce a transportéry, je pro bakterii nesmírně důležité udržovat membránu stále fluidní (Bakermans et al., 2014). Genom kmene *Rhodococcus* sp. JG3 kóduje enzym desaturázu mastných kyselin, která při nízkých teplotách zvyšuje poměr nenasyčených mastných kyselin ku nasyceným a činí tak membránu fluidnější. Také kóduje enzymy KAS-II a KAS-III účastníci se syntézy lineárních a větvených mastných kyselin.

Jak již bylo zmíněno, s chladovým stresem se pojí také stres z hladovění, jelikož v permafrostu panují hyperoligotrofní podmínky. Kvůli nedostatku živin buňky potřebují značné zásoby energie. *Rhodococcus* sp. JG3 uchovává energii a zásoby uhlíku ve formě triacylglycerolů (TAG), které produkuje z mnoha různých zdrojů a v případě potřeby je přeměňuje na klíčové metabolity – pyruvát, acetyl-CoA a glycerol-3-fosfát (Alvarez et al., 2013). Genom kmene JG3 obsahuje také geny, které kódují enzymy metabolismu glykogenu, včetně odvětovacího enzymu glykogenu (*debranching enzyme*).

Intracelulární prostor je u *Rhodococcus* sp. chráněn před mrazem a osmotickým tlakem osmoticky aktivními látkami (osmoprotektanty, kompatibilní soluty) rozpustnými ve vodě. Ve srovnání s mezofilními kmeny má *Rhodococcus* sp. JG3 více kopií genů pro syntézu glycinu, betainu, cholinu a sarkosinu (Goordial et al., 2016).

2.2 Teplotní stres

Ačkoliv habitaty s vysokou teplotou nejsou na Zemi zastoupeny tak významně, jako habitaty s nízkou teplotou, diverzita zde žijících mikroorganismů je značná. Dokazují to mnohé studie z oblastí výskytu termálních pramenů a tzv. černých kuřáků, např. Yellowstone National Park v USA (Barns et al., 1994), Island (Takacs et al., 2001), Itálie (Maugeri et al., 2001), Turecko (Baltaci et al., 2017) a Lōʻihi Seamount na Havaji (Moyer et al., 1995).

Mikroorganismy žijící ve vysokých teplotách dělíme na termofilní, které žijí v teplotách od 55 do 80 °C a hypertermofilní žijící v teplotách nad 80 °C (Baross & Holden, 1996). V těchto podmínkách dochází k denaturaci proteinů i nukleových kyselin a výrazně se zvyšuje fluidita membrány, což může být pro buňku letální (Rothschild & Mancinelli, 2001).

Bakterie na teplotní stres obecně reagují syntézou proteinů teplotního šoku (*heat-shock proteins*, Hsp). Patří do nich chaperony, které pomáhají sbalit špatně poskládané nebo agregované proteiny do nativní konformace, a ATP-dependentní proteázy degradující nenávratně poškozené a nesbalené proteiny (Wickner et al., 1999; Dougan et al., 2002). Řídícími jednotkami stresové odpovědi jsou alternativní sigma faktory rozpoznávající různé třídy promotorů (Ventura et al., 2006). Za regulaci stresových odpovědí spojených se změnami okolního prostředí je u kmene *Actinobacteria* zodpovědný sigma faktor σ^E patřící do 4. skupiny sigma faktorů (Gruber & Gross, 2003). Geny pro sigma faktory (4. skupiny) jsou zpravidla transkribovány zároveň s genem pro anti-sigma faktor, který po navázání slouží jako inhibitor příslušného sigma faktoru. Po stimulaci signálem z vnějšího prostředí je anti-sigma faktor různými mechanismy odstraněn a sigma faktor tak může asociovat s RNA polymerázou (Missiakas & Raina, 1998; shrnuto v Helmann, 2002).

U *Corynebacterium glutamicum* (druh příbuzný kmenům rodu *Rhodococcus*) hraje v regulaci teplotního stresu důležitou roli ECF sigma faktor SigH. Reguluje expresi celkem 45 genů, které se podílí na stresové odpovědi, včetně většiny HSP genů (Ehira et al., 2009).

Které sigma faktory hrají roli v teplotním stresu u rodu *Rhodococcus* zatím není známo. První studie na toto téma byla provedena u *Rhodococcus jostii* RHA1. Ekpanyaskun (2006) ve své diplomové práci naznačuje roli sigma faktoru kódovaného genem *ro04728* a transkripčního regulátoru *ro04729* kódovaného na protějším vlákně. Tyto dva geny vykazují podobné profily exprese (*expression patterns*) také při osmotickém stresu.

Ekpanyaskun ve své práci také naznačuje možnou konzervovanost mechanismů teplotní stresové odpovědi mezi aktinomycetami. U *R. jostii* RHA1 vykazuje v odpovědi na zvýšení teploty zvýšenou hladinu devět *hsp* genů včetně genů pro chaperony, GroEL, GrpE, DnaK a

HspA. Podobné geny pro DnaK, DnaJ, GroEL a Clp pro proteázovou podjednotku, vykazují zvýšenou hladinu také u *Corynebacterium glutamicum* (Muffler et al., 2002).

Funkce *hsp* genů u kmene *R. jostii* RHA1 není blíže prozkoumána, ale ukazuje se, že vzhledem k malému procentu indukovaných proteáz by mohly některé geny pro Hsp vykazovat proteázové funkce a zastoupit tak proteázy v odpovědi na teplotní stres (Ekpanyaskun, 2006).

Jak již bylo zmíněno, se zvyšující se teplotou dochází také ke zvyšování fluidity membrány. K zabránění zvyšování fluidity až k hyperfluidnímu stavu slouží malé proteiny teplotního šoku (*small heat-shock proteins*, sHsp) (Tsvejkova et al., 2002). V odpovědi na teplotní stres u *Rhodococcus ruber* TH3 vykazuje nejvyšší hladinu Hsp 16, který velkou měrou přispívá k regulaci membránové fluidity, zachování integrity membrány, a tedy k zajištění životaschopnosti *R. ruber* TH3 ve vysokých teplotách (Wang et al., 2018).

2.3 Osmotický stres

Voda je nejdůležitějším rozpouštědlem na Zemi. Její množství a dostupnost ovlivňují diverzitu mikrobiálního života. Důležitým faktorem je osmolarita – množství ve vodě rozpuštěných osmoticky aktivních látek (např. soli, cukry). Navázáním vody na tyto látky se voda stává pro mikroorganismy hůře dostupnou. Bakteriální buňky si proti okolnímu prostředí udržují osmotický přetlak, obsahují tedy vyšší koncentraci rozpuštěných látek. Voda tak v normálním případě (nižší osmolaritě okolí) vstupuje semipermeabilní membránou do cytoplazmy.

Osmolarita v prostředí nebývá stálou veličinou a značně se mění. Tuto fluktuaci musí mikroorganismy neustále vyrovnávat. Při prudkém zvýšení koncentrace rozpuštěných látek v prostředí (hyperosmotické prostředí) by mohlo dojít k dehydrataci buňky, při prudkém snížení koncentrace rozpuštěných látek v okolí (hypoosmotické prostředí) by mohla buňka vlivem přísunu velkého množství vody do cytoplazmy prasknout (shrnuto v Csonka, 1989 a Bremer & Krämer, 2019).

Na osmotický stres způsobený fluktuací osmolarity reagují mikroorganismy zvýšením koncentrace rozpuštěných látek v cytoplazmě – osmoprotektantů, kompatibilních solutů. Tyto látky musí být v naprosté shodě s buněčnou fyziologií, nesmí nijak narušit metabolismus buňky (Brown & Simpson, 1972).

Rhodococcus sp. JG3 izolovaný z antarktického permafrostu (Möker et al., 2004) kromě chladového a oxidativního stresu čelí také osmotickému stresu (viz podkapitola 2.1). Ve srovnání s mezofilními kmeny rodu *Rhodococcus* obsahuje genom *Rhodococcus* sp. JG3

znatelně více kódujících sekvencí pro proteiny související svou funkcí s osmotickým stresem (viz Tabulka 1).

Tab. 1: Počty kopií genů osmotické stresové odpovědi u *Rhodococcus* sp. JG3 a mezofilních kmenů rodu *Rhodococcus* (Goordial et al., 2016, upraveno)

Předpokládaný protein	<i>Rhodococcus</i> sp. JG3	<i>Rhodococcus</i> <i>erythropolis</i> CCM2595	<i>Rhodococcus</i> <i>pridinivorans</i> B3094	<i>Rhodococcus</i> <i>pridinivorans</i> AK376	<i>Rhodococcus</i> <i>qingshengii</i> BKS20-40	<i>Rhodococcus</i> <i>rhodochrous</i> BKS6-46
Periplazmatický (lipo)protein ABC transportéru vázající glycin betain/cholin	3	-	2	-	-	2
Cholin/karnitin/betainový transportér	2	-	2	-	-	3
Cholindehydrogenáza	7	1	8	-	1	8
ATPázové komponenty prolin/glycin betain ABC transportéru	2	-	1	-	-	1
Permeázová komponenta prolin/glycin betain ABC transportéru	4	-	2	-	-	2
Substrát vázající protein (rodina PAAT) aminokyselinového ABC transportéru	6	2	-	1	3	-
Sarkozinoxidáza	3	1	-	1	1	-
Cholinoxidáza	1	-	-	-	-	-

R. jostii RHA1 v odpovědi na osmotický stres indukovaný 0,6 M NaCl syntetizuje z kompatibilních solutů pouze L-ektoin. Z analýzy genomu však vyplývá, že za jiných podmínek je buňka schopna syntetizovat také hydroxyektin, trehalózu, prolin, glutamát a glycin betain (Ekpanyaskun, 2006).

Zachycení a přenos signálu o změně podmínek zajišťují u bakterií dvousložkové systémy. U *C. glutamicum* zajišťuje tyto funkce v souvislosti s osmotickým stresem např. dvousložkový systém MtrAB. Ten se skládá z membránové histidinové proteinkinázy MtrB, která se autofosforyluje v odpovědi na vnější signál a předává fosfát cytoplazmatickému regulátoru odpovědi MtrA. Fosforylace MtrA ovlivňuje jeho schopnost vázat DNA, čímž ovlivňuje transkripci příslušných genů. MtrAB u *C. glutamicum* reguluje expresi genů pro biosyntézu buněčné stěny a genů pro proteiny, které akumulují kompatibilní soluty – *betP*, *lcoP* a *proP* (*uptake systems*).

Porovnáním sekvencí (konkrétně periplazmatické domény histidinové proteinkinázy) byly velmi podobné proteiny objeveny také například u *Rhodococcus* sp. I24, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium leprae* a *Corynebacterium diphtheriae* (Möker et al., 2004).

V odpovědi na osmotický stres hraje u *R. jostii* RHA1 roli také protein ochrany DNA při hladovění (*DNA protection during starvation protein*, Dps). Hladina genu pro Dps (*ro00101*) byla podle Ekpanyaskuna (2006) výrazně zvýšena 15, 30, 45 min a 2 h po nástupu osmotického stresu. Dps navázáním na DNA chrání před oxidativním stresem a je důležitý také jako protein vázající železo (Gupta & Chatterji, 2005).

2.4 Vysychání

Pro půdní mikroorganismy je množství dostupné vody v prostředí zásadním faktorem přežití. Množství vody v daném prostředí popisuje vodní aktivita a_w . Tato veličina je dána podílem parciálního tlaku vodní páry nad rozpuštěnou látkou a parciálního tlaku vodní páry nad čistou (destilovanou) vodou. Dosahuje hodnot od 0 do 1, přičemž většina bakterií není schopna dělení v hodnotách vodní aktivity nižších než 0,91 (Lebre et al., 2017). Některé xerofilní druhy bakterií a archea jsou aktivní i v hodnotách nižších než 0,755 (Stevenson et al., 2015).

Podíl aridních oblastí je na Zemi kolem 10 % a vlivem desertifikace a klimatických změn se očekává jejich nárůst. V těchto oblastech se mikroorganismy potýkají nejen s nedostatkem vody, ale také s nedostatkem živin, extrémními teplotami a intenzivním zářením (Verón et al., 2006; Dai et al., 2015). Intenzivní záření vyvolává vznik reaktivních kyslíkových radikálů (ROS), které vážně poškozují DNA a komponenty respiračního řetězce. Při nedostatku vody má extracelulární prostředí větší osmolaritu. Buňka syntetizuje kompatibilní soluty (např. prolin, trehalóza, glutamát a ektoin), které kompenzují vyšší koncentraci rozpuštěných látek v okolí a chrání makromolekuly a membránu před případným poškozením. K minimalizaci ztrát vody vylučují buňky extracelulární polysacharidovou matrix, která obklopuje buňku a zároveň umožní agregaci buněk, aby byla zajištěna co největší ochrana (Billi & Potts, 2000; Potts, 2001; Fredrickson et al., 2008).

Rhodococcus opacus PD630 se ukázal jako velmi rezistentní vůči vysychání. Bakteriální buňky jsou v podmínkách nedostatku vody schopny přežít i několik měsíců. Se snižujícím se množstvím vody se u kmene PD630 projevuje osmotický stres a s ním související stresové odpovědi. Nejzásadnější odpovědí je syntéza kompatibilních solutů – trehalózy nebo hydroxyektoinu (v závislosti na zdroji uhlíku).

Během prvních hodin po nástupu stresové odpovědi dochází v buňkách k drastickému snížení metabolické aktivity na úroveň zachování nezbytných životních dějů. V průběhu dehydratace buněk zůstává aktivní dráha β -oxidace, díky které buňka využívá své zásoby lipidů

jako zdroje uhlíku a energie. Mastné kyseliny získané z triacylglycerolů zjevně slouží také jako prekurzory v biosyntéze mykolových kyselin, které se podílejí na adaptaci buněčné stěny (Alvarez et al., 2004).

Dalším důležitým prvkem v obraně proti vysychání je produkce extracelulárních polysacharidů (EPS), které slouží jako rezervoáry vody a poskytují bakteriím více času k fyziologickému přizpůsobení na probíhající stres (Roberson & Firestone, 1992; Alvarez et al., 2004).

Mechanismy, kterými se bakterie rodu *Rhodococcus* přizpůsobují vysychání byly blíže popsány u *R. jostii* RHA1 (LeBlanc et al., 2008). V odpovědi na stres způsobený vysycháním prostředí vykazuje zvýšenou expresi (*up-regulation*) 406 genů a sníženou expresi 379 genů (*down-regulation*), které náleží třem genovým shlukům. Exprese největšího shluku genů se zvyšuje po dobu 12 hodin a poté zůstává zvýšená, zatímco exprese dvou menších genových shluků je okamžitá, a zvýšená zůstává pouze u většího z těchto dvou shluků. Nejvýznamnějším genem, který se účastní stresové odpovědi u kmene RHA1 je *dps1* kódující protein ochrany DNA při hladovění (Dps). Během vysychání vykazují zvýšené hladiny také sousedící konzervované hypotetické geny *ro00102* a *ro00103* a blízké (odlišně transkribované) geny kódující sigma faktor SigF1 a příslušný anti-sigma faktor. U těchto genů koreluje profil genové exprese s *dps1* z 99 %. Z 95 % korelují profily genové exprese například genu kódujícího sigma faktor SigF3, pravděpodobného genu pro transkripční regulátor z rodiny MerR a předpokládaných genů pro oxidoreduktázu a dehydrogenázu. Transkripci zmíněných genů zajišťují alternativní sigma faktory SigF1 a SigF3. Mechanismus signální odpovědi a geny, které tyto sigma faktory (jako podjednotky RNA polymerázy) transkribují, zatím nejsou známy (LeBlanc et al., 2008). Je zajímavé, že všechny faktory SigF patří do 3. skupiny (Gruber & Gross, 2003), zatímco při stresech hlavní roli hrají většinou sigma faktory 4. skupiny (ECF) (LeBlanc et al., 2008).

2.5 pH stres

Růst a přežití mikroorganismů v prostředí ovlivňují hodnoty vnějšího pH, resp. jejich definované rozmezí. Přestože jsou mikroorganismy obecně citlivější ke změnám intracelulárního pH než k vnějším změnám, jsou větší změny hodnot v obou případech letální (Beales, 2004). Většina neutrofilních bakterií preferuje hodnoty pH 5,0–9,0 (Slonczewski et al., 2009). Extrémně acidofilní bakterie, rostoucí v geotermálních oblastech, oblastech těžby a v kyselých půdách, jsou přizpůsobeny pH 1,0–3,0 (Edwards, 1990; Krulwich et al., 2011). Naopak extrémně alkalifilní bakterie rostou v pH 10,0–13,0 a vyskytují se například v oblastech sodných jezer a čističkách odpadních vod (Gerday & Glansdorff, 2007; Krulwich et al., 2011).

Hodnoty extracelulárního pH ovlivňují hodnoty vnitřního pH v cytoplazmě bakterií. Hodnoty intracelulárního pH mají vliv na funkčnost a stabilitu proteinů, aktivitu enzymů a ovlivňují strukturu nukleových kyselin a dalších biologických molekul (Slonczewski et al., 2009). Většina studií byla provedena u *Escherichia coli* nebo *Bacillus* sp.

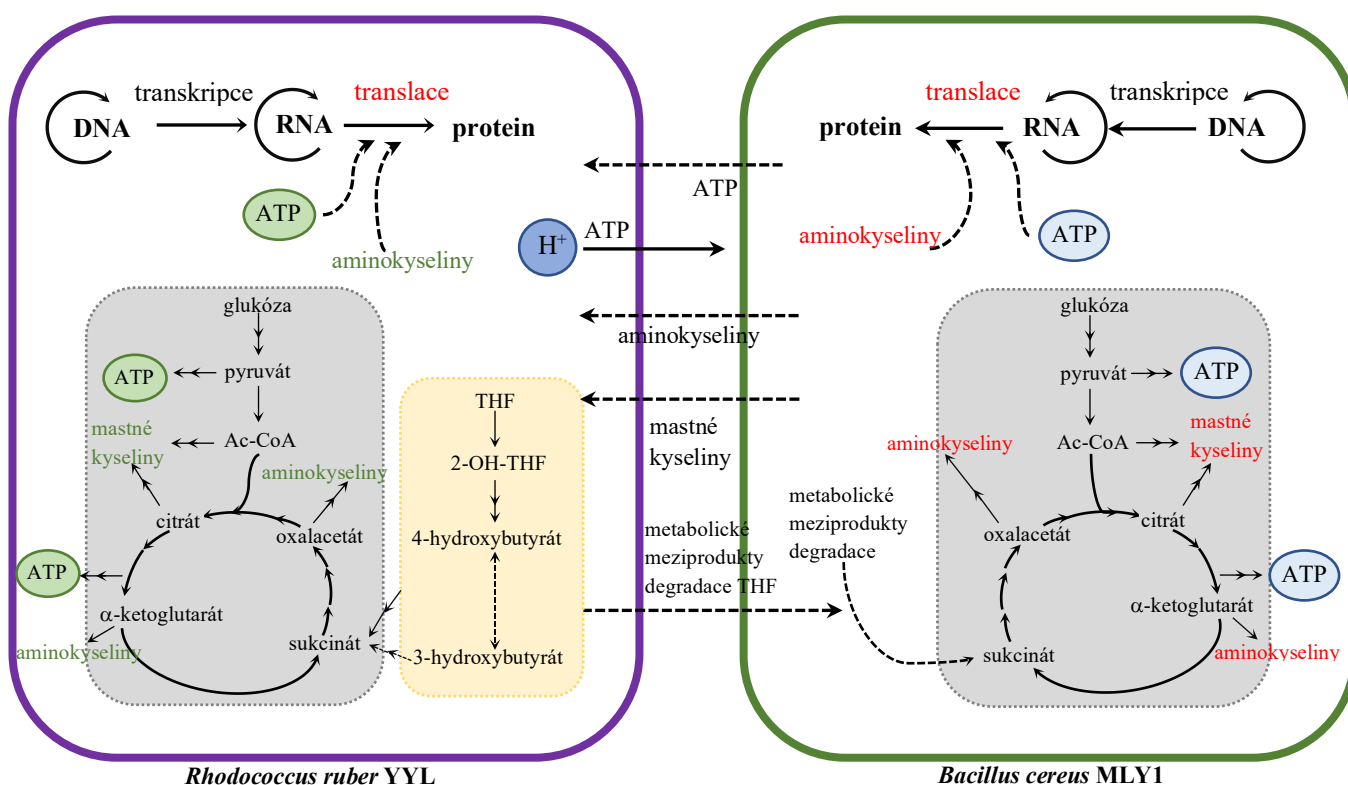
Fenotypová *microarray*-analýza odhalila u dvou kmenů – *Rhodococcus aetherivorans* BCP1 a *R. opacus* R7 metabolickou aktivitu při hodnotách pH od 5 do 10, a u kmene R7 i při pH 4,5, což naznačuje efektivní přizpůsobení alkalickému i kyselému prostředí. Mechanismů odpovědi na pH stres se účastní některé transportní proteiny, například F_1F_0 -ATPázy a další antiportéry monovalentních kationtů/protonů. V prostředí s nízkým pH napomáhají přežití také dekarboxylázové systémy aminokyselin. Genomy obou kmenů obsahují kódující sekvence dekarboxyláz argininu, lysinu a kyseliny glutamové (Cappelletti et al., 2016). Tyto dekarboxylázové systémy ovlivňují intracelulární pH importem H^+ (Kanamori et al., 2004). Oba kmeny disponují geny, které kódují enzymy metabolismu močoviny. Enzymy ureáza a amidolýza degradují močovinu na kyselinu uhličitou a amoniak, čímž kompenzují nízké intracelulární pH (Van Vliet et al., 2004). Genom *R. opacus* R7 obsahuje na rozdíl od *R. aetherivorans* BCP1 kompletní ureázovou genovou kazetu, která kóduje tři strukturní proteiny (UreA, UreB, UreC) a geny pro tři přídatné proteiny (*accessory proteins*) – UreF, UreG, UreD (viz Obr.2). Tento rozdíl pravděpodobně souvisí se schopností kmene R7 být metabolicky aktivní i v pH 4,5 (Cappelletti et al., 2016).

U *R. ruber* YYL dochází vlivem nízkého pH (nižší než preferované – tj. pH 7) k nárůstu biosyntézy a degradace steroidů, degradace aromatických sloučenin, xylenu a dioxinu, nárůstu transportu RNA a sestřihu pre-mRNA (*splicing*). Zvyšuje se mutační aktivita a aktivita následných opravných mechanismů (*non-homologous end-joining*), biosyntéza žlučových

kyselin a metabolismus kyseliny alfa-linolenové. Sníženou aktivitu vykazuje ATPáza, metabolismus sacharidů a buněčné dýchání (Liu et al., 2017).

Ve společné kultuře *Rhodococcus ruber* YYL a *Bacillus cereus* MLY1, rostoucích za nízkého pH v přítomnosti tetrahydrofuranu (THF), byl u kmene YYL zjištěn pokles biosyntézy valinu, leucinu a isoleucinu. U *Bacillus cereus* MLY1 naopak dochází k nárůstu biosyntézy aminokyselin a zvýšené aktivitě translačních mechanismů. Dá se předpokládat, že kmen MLY1 poskytuje kmeni YYL některé aminokyseliny a proteiny, čímž buňkám pomáhá překonávat pH stres (viz Obr.3).

Obr. 2: Schéma mezidruhové kooperace mezi *Rhodococcus ruber* YYL a *Bacillus cereus* MLY1 při pH stresu během degradace THF. Červený text představuje zvýšenou aktivitu metabolismů, zelený text sníženou aktivitu metabolismů (Liu et al., 2017, upraveno).



Potvrzuje to i fakt, že *Rhodococcus ruber* YYL je při optimálním pH schopen degradovat THF, ale při snížení pH z 8,3 na 7 je degradace velmi neefektivní. *Bacillus cereus* MLY1 nevykazuje žádné schopnosti degradovat THF, avšak ve společné kultuře s *Rhodococcus ruber* YYL dochází k úplné degradaci THF (Liu et al., 2017).

3. Stres při degradacích toxických sloučenin

Bakterie rodu *Rhodococcus* disponují velkým genomem (např. *R. jostii* RHA1 s genomem 9,7 Mbp), který jim společně s plazmidy poskytuje velké množství genů pro širokou škálu katabolických drah (McLeod et al., 2006). Některé kmeny mají navíc genom velmi flexibilní díky častějším rekombinacím, čímž si mnohem snadněji osvojují nové geny a s nimi související nové enzymové aktivity (Larkin et al., 2006). Tyto vlastnosti (společně s rozvíjejícím se genovým inženýrstvím) dělají z bakterií rodu *Rhodococcus* vhodné bioremediační a dekontaminační nástroje. Základním předpokladem jejich využití v biotechnologiích je znalost nejen degradačních drah, na které se většina studií zaměřuje, ale také stresových reakcí nastávajících v přítomnosti dané toxické sloučeniny (shrnuoto v Martínková et al., 2009).

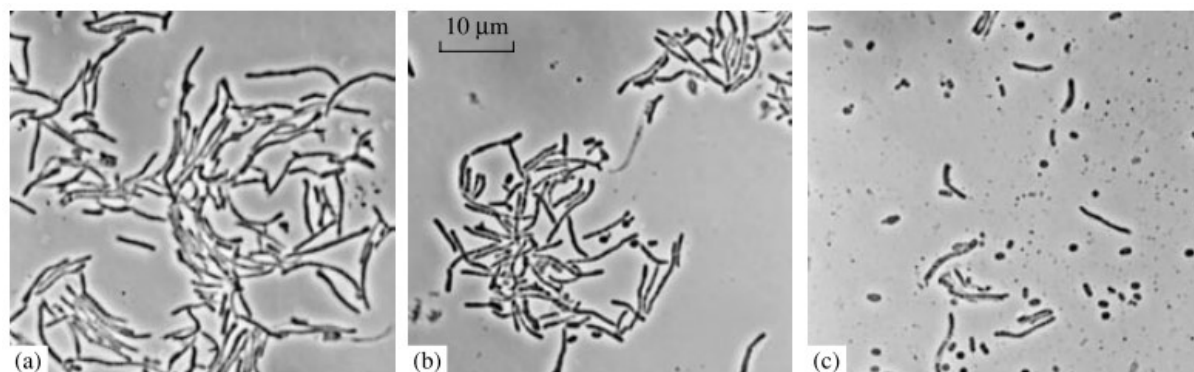
3.1 Fenoly

Fenoly jsou toxické organické sloučeniny, které se v prostředí vyskytují především činností chemického, ropného a farmaceutického průmyslu, a produkcí a používáním pesticidů. Odtokem komunálních nebo průmyslových odpadních vod se fenoly dostávají do povrchových vod (Michałowicz & Duda, 2005; Michałowicz & Duda, 2007). Některé fenoly mohou vznikat i v přírodě – rozkladem organického materiálu (fenol, p-kresol) nebo syntézou rostlinami či houbami (chlorované fenoly) (Michałowicz & Duda, 2007; Swarts et al., 1998). Toxicita fenolů spočívá v jejich hydrofobicitě a schopnosti vytvářet volné radikály (Hansch et al., 2000).

Kmeny *R. opacus* PD630 (evol33, evol40) adaptované růstu ve vyšších koncentracích fenolu patří mezi kmeny, které umí nejefektivněji degradovat fenol (Yoneda et al., 2016). U původních (*wild type*) i adaptovaných kmenů *R. opacus* PD630 vykazuje vysokou hladinu protein ochrany DNA při hladovění (Dps), molekulárního chaperonu DnaK a homologu proteinu teplotního šoku (*heat-shock protein 20 homolog*). Dps se uplatňuje v odpovědi na oxidativní stres (Almiron et al., 1992). Jeho nižší hladina v adaptovaných kmenech (evol33, evol40) naznačuje, že tyto kmeny trpí oxidativním stresem méně než výchozí kmen (Yoneda et al., 2016).

Kultivace *R. opacus* 1CP na médiu obsahujícím 4-chlorofenol a 2-chlorofenol ukázala rozdíly v morfologii jednotlivých kolonií (viz Obr.4) (Kolomytseva et al., 2005). Růstu na fenolech jsou lépe přizpůsobeny varianty S (hladké, *smooth*) než R (drsne, *rough*). Kolonie varianty S jsou větší a mají protáhlý tyčinkovitý tvar, a tedy i větší povrch,

Obr. 3: Morfologie různých variant kolonií *Rhodococcus opacus* 1CP kultivovaných na médiu s obsahem 4-chlorofenolu a 2-chlorofenolu. (a) S1; (b) S2; (c) R. Varianty S (a,b) jsou díky svému tyčinkovitému tvaru lépe přizpůsobeny růstu na fenolech. Jejich větší povrch v porovnání s variantou R (c) umožňuje efektivnější vstřebávání substrátu a intenzivnější metabolismus (Kolomytseva et al., 2005).



který umožňuje větší vstřebávání substrátu, což vede k intenzivnějším metabolickým procesům. Ve srovnání s variantou R obsahují kolonie typu S také více mastných kyselin a fosfolipidů (kardiolipin, fosfatidyletanolamin) (Kolomytseva et al., 2005).

3.2 Monocyklické aromatické uhlovodíky

Monocyklické aromatické uhlovodíky (areny) jsou sloučeniny obsahující jedno benzenové jádro (De Carvalho, 2010). Jsou nejběžnějšími aromatickými sloučeninami v prostředí a vznikají různými biologickými i geochemickými procesy. Benzen a jeho deriváty jsou díky své stabilitě využívány v zemědělství, v chemickém a ropném průmyslu (využití BTEX – směs benzenu, toluenu, ethylbenzenu a xylenu). Náhodnými úniky z oblastí těžby ropy a jejich úložišť se dostávají do povrchové vody (Siegrist, 1991; shrnuto v De Carvalho, 2010).

Obecně mají cyklické uhlovodíky hydrofobní charakter, čímž jsou toxické především pro buněčné membrány (Sikkema et al., 1994). Akumulují se v lipidových dvojvrstvách a již velmi nízké koncentrace (0,1 %) mohou být pro mikroorganismy letální (Moriya & Horikoshi, 1993; Sikkema et al., 1994).

Blíže nespecifikovaný kmen *Rhodococcus* sp. izolovaný z kontaminovaných oblastí v Austrálii naznačil zajímavou strategii v odpovědi na stres způsobený přítomností benzenu (Gutiérrez et al., 2003). Již po 0,5 h inkubace s benzenem bylo patrné zvýšení fluidity membrány, které buňkami nebylo kompenzováno po celých 6 h kultivace. První známky snižování fluidity membrán byly patrné až po 18–20 hodinách kultivace v přítomnosti benzenu. Snižování fluidity je výsledkem změn poměru nasycených/nenasycených mastných kyselin v membránách, na kterých se podílejí kyselina myristová a k. olejová. Adaptivní odpověď se

v tomto případě objevila po dlouhém vystavení stresoru, což poukazuje na velmi dobré přizpůsobení buněk v počáteční (6 h) fázi. Takovéto přizpůsobení je výhodné v případech, kdy je buňka vystavena skokovému nárůstu koncentrace benzenu či jiné toxické látky v prostředí (Gutiérrez et al., 2003).

Analýza proteomu *Rhodococcus ruber* SD3 rostoucího na médiu s toluenem ukázala největší metabolickou aktivitu u degradační dráhy mastných kyselin a benzoátu (Kuang, Fan, & Peng, 2018). Stresová odpověď u *R. ruber* SD3 zahrnuje zvýšení syntézy univerzálního stresového proteinu z rodiny CspA a chaperoninu, který zabraňuje špatnému sbalení proteinů a pomáhá se správným sbalením nově syntetizovaných polypeptidů za stresových podmínek. Pro kompenzaci oxidativního stresu buňka zvyšuje syntézu katalázy a proteinu RecA, který se podílí na opravách poškozené DNA. Zvýšená syntéza membránových proteinů – transportéru aminokyselin, benzoátového transportního proteinu, vanilátového transportéru, permeázy gama-aminomáselné kyseliny a permeázy z rodiny MFS (*major facilitator superfamily*) – demonstruje jejich úlohu v obraně před škodlivými účinky rozpouštědla (Kuang et al., 2018; Qiao et al., 2012).

3.3 Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU)

Polycyklické aromatické uhlovodíky představují skupinu organických sloučenin, které jsou složeny ze tří a více benzenových jader. Vznikají nedokonalým spalováním organických sloučenin a jsou obsaženy ve výfukových plynech, v tabákovém kouři a v uzeném jídle (Lijinsky, 1991). Do prostředí se PAU v největší míře dostávají přes průmyslové odpadní vody (procesy zplyňování a zkapalňování uhlí), ze spalování odpadů, koksu, sazí a dalších ropných produktů. PAU jsou hydrofobní sloučeniny a kvůli své nízké rozpustnosti ve vodě a asociaci se sedimenty jsou rezistentní vůči degradaci a přetrvávají v prostředí (Cerniglia, 1993).

Bakterie rodu *Rhodococcus* se řadí mezi nejlepší degradéry PAU. Jako zdroj uhlíku a energie jsou schopny využít např. fenantren, anthracen, benzo(a)pyren a fluoranthen (Song et al., 2011).

Přítomnost naftalenu, motorové nafty a cyklohexanu v médiu způsobuje u *Rhodococcus erythropolis* oxidativní stres doprovázený vznikem velkého množství reaktivních forem kyslíku (Sazykin et al., 2019). Velké množství ROS v buňce vede k poškození DNA. V odpovědi na oxidativní stres způsobený zmíněnými PAU dochází u *R. erythropolis* ke zvýšení exprese *cyp153*, *recA*, *sodA* (gen pro Fe/Mn superoxiddismutázu), a v případě kultivace s naftalenem také *sodC* (gen pro Cu/Zn superoxiddismutázu). Mechanismy, kterými je opravována DNA

(např. SOS odpověď s účastí proteinu RecA) poškozená superoxidovými radikály, se zvyšuje mutagenese (DNA). Dochází tak ke zrychlené molekulární evoluci *R. erythropolis* (Sazykin et al., 2019).

Rhodococcus sp. BAP-1 vystavený fluoranthenu zvyšuje expresi genů především pro metabolické děje (syntéza a přeměna energie, transport, substrát-vázající proteiny) a pro enzymy, které zbavují buňku ROS (aldehyddehydrogenáza, cytochrom c oxidáza). Sbalení nesprávně sbalených proteinů řídí hojně exprimovaný chaperon GroES (Wang et al., 2019). Přítomnost fluoranthenu indukuje expresi univerzálního stresového proteinu UspA, který pomáhá bakteriálním buňkám překonat stres z hladovění a oxidativní stres (Liu et al., 2007).

3.4 Polychlorované bifenyly (PCB)

Polychlorované bifenyly jsou perzistentní organické sloučeniny, které byly v minulosti syntetizovány katalytickou chlorací bifenyly. Není znám žádný přírodní zdroj PCB. Do vzduchu, vody a půdy se dostávaly během výroby, náhodnými úniky při transportu a při jejich likvidaci. PCB byly využívány pro svou tepelnou a chemickou stabilitu a nehořlavost, díky čemuž jsou téměř rezistentní k degradaci a nyní přetrvávají v prostředí (shrnuto v Borja et al., 2005). Bioremediace oblastí kontaminovaných PCB by tedy mohla být účinným řešením tohoto environmentálního problému (Ohtsubo et al., 2004).

PCB způsobují u mikroorganismů celou řadu nežádoucích reakcí. Kvůli své rozpustnosti v lipidech se akumulují v buněčných membránách (shrnuto v Sikkema et al., 1995). Degradační schopnosti mohou být také značně ovlivněny meziprodukty a metabolity vznikajícími v průběhu jejich degradace – např. bifenyl dihydrodioly a dihydroxybifenyly jsou podle Cámara et al. (2007) velmi toxické a snižují životaschopnost bakterií mnohem více než PCB. Toxicita PCB tkví především v generování oxidativního stresu a tím produkci velkého množství ROS (Chávez et al., 2004).

V odpovědi na oxidativní stres dochází u *Rhodococcus aetherivorans* I24 ke zvýšení exprese *sodA* (superoxiddismutáza), *katG* (kataláza-peroxidáza), *ahpC* (alkylhydroperoxidreduktáza C), *groEL* (chaperon) a genů pro thioredoxin, thioredoxinreduktázu a univerzální stresový protein (Puglisi et al., 2010). Zajímavým zjištěním Puglisiho et al. je snížená nebo chybějící exprese genů účastnících se metabolické dráhy vedoucí k degradaci PCB i přesto, že genom *R. aetherivorans* I24 obsahuje všechny klíčové enzymy. Je tedy zřejmé, že u *R. aetherivorans* I24 dochází spíše ke kompenzaci nastávajícího

oxidativního stresu, než k přímému využití PCB jako zdroje uhlíku a energie (Puglisi et al., 2010).

Mnohem lepších výsledků dosahuje kmen *R. jostii* RHA1, který k přeměně PCB využívá homology Bph a Etb metabolických drah původně vyvinutých spíše k přeměně bifenolu a ethylbenzenu (Iwasaki et al., 2006; Patrauchan et al., 2008). Kmen *R. jostii* RHA1 kultivovaný na médiích s aromatickými sloučeninami (benzen, styren, bifenyly, ethylbenzen) vykazuje zvýšenou expresi katalázy, alkylhydroxyperoxidreduktázy (AhpC) a Clp proteázy, tedy enzymů typických pro odpověď na oxidativní stres (Patrauchan et al., 2008).

5. Závěr

Bakterie rodu *Rhodococcus* reagují na stresové podmínky změnami v genové expresi, které zajišťují transkripční regulátory, dvousložkové systémy a sigma faktory RNA polymerázy. V závislosti na charakteru stresu se zvýšení exprese týká nejčastěji genů pro univerzální stresový protein, genů pro chaperony, chaperoniny (bránící vzniku agregátů a opravující špatně sbalené proteiny) a genů pro proteázy. Zvýšená exprese je typická také pro geny kódující proteiny opravy poškozené DNA a enzymy zbavující buňku reaktivních forem kyslíku.

Stresové odpovědi jsou mnohdy komplexního rázu. Druhy rostoucí například v extrémně nízkých teplotách nereagují jen na nízkou teplotu, ale také na nedostatek živin a oxidativní stres plynoucí z nadměrného slunečního osvětlení. Některé stresové odpovědi je náročné oddělit od sebe, jelikož se překrývají i skupiny genů, které na ně reagují.

Schopnost degradace toxických sloučenin s sebou přináší nutnost adaptace na oxidativní stres, podstatné změny ve složení buněčných membrán a celkové změny morfologie buněk. Souvislosti mezi stresovými odpověďmi a jejich mechanismy jsou velmi důležité pro možné využití rhodokoků v biotechnologiích. Díky velkému a flexibilnímu genomu jsou rhodokoky výbornými kandidáty na použití při bioremediacích a biotechnologiích obecně. I přes velké množství dat, které byly dosud získány z výzkumu stresových odpovědí u rhodokoků (analýza transkriptomu a proteomu) je další rozšíření těchto studií klíčové pro zvýšení efektivity při bioremediacích a dekontaminacích.

Literatura

- Almiron, M., Link, A. J., Furlong, D., & Kolter, R. (1992). A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes and Development*, 6(12 B), 2646–2654.
- Alvarez, Héctor M., Roxana A. Silva, M. H., Hernández, Martín A. María, A., & Villalba, S. (2013). Metabolism of triacylglycerols in *Rhodococcus* species: insights from physiology and molecular genetics. *Journal of Molecular Biochemistry*, 2(1), 69–78.
- Alvarez, H. M., Silva, R. A., Cesari, A. C., Zamit, A. L., Peressutti, S. R., Reichelt, R., ... Steinbüchel, A. (2004). Physiological and morphological responses of the soil bacterium *Rhodococcus opacus* strain PD630 to water stress. *FEMS Microbiology Ecology*, 50(2), 75–86.
- Bakermans, C., Bergholz, P. W., Rodrigues, D. F., Vishnivetskaya, T. A., Ayala-del-Río, H. L., & Tiedje, J. M. (2014). Genomic and expression analyses of cold-adapted microorganisms. In *Polar Microbiology: Life in a Deep Freeze* (pp. 126–155).
- Baltaci, M. O., Genc, B., Arslan, S., Adiguzel, G., & Adiguzel, A. (2017). Isolation and characterization of thermophilic Bacteria from geothermal areas in Turkey and preliminary research on biotechnologically important enzyme production. *Geomicrobiology Journal*, 34(1), 53–62.
- Barns, S. M., Fundyga, R. E., Jeffries, M. W., & Pace, N. R. (1994). Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(5), 1609–1613.
- Baross, J. A., & Holden, J. F. (1996). Overview of hyperthermophiles and their heat-shock proteins. *Advances in Protein Chemistry*, Vol. 48, pp. 1–34.
- Beales, N. (2004). Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3(1), 1–20.
- Belfiore, C., Curia, M. V., & Farías, M. E. (2018). Characterization of *Rhodococcus* sp. A5wh isolated from a high altitude Andean lake to unravel the survival strategy under lithium stress. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(3), 311–322.
- Bell, K. S., Philp, J. C., Aw, D. W. J., & Christofi, N. (1998). A review: The genus *Rhodococcus*. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 85, pp. 195–210.
- Billi, D., & Potts, M. (2000). Life without water: Responses of prokaryotes to desiccation. In *Cell and Molecular Response to Stress* (Vol. 1, pp. 181–192).
- Borja, J., Taleon, D. M., Auresenia, J., & Gallardo, S. (2005). Polychlorinated biphenyls and their biodegradation. *Process Biochemistry*, Vol. 40, pp. 1999–2013.
- Bremer, E., & Krämer, R. (2019). Responses of microorganisms to osmotic stress. *Annual Review of Microbiology*, 73(1), 313–334.
- Brown, A. D., & Simpson, J. R. (1972). Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. *Journal of General Microbiology*, 72(3), 589–591.
- Cámara, B., Seeger, M., González, M., Standfuß-Gabisch, C., Kahl, S., & Hofer, B. (2007). Generation by a widely applicable approach of a hybrid dioxygenase showing improved oxidation of polychlorobiphenyls. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(8), 2682–2689.
- Cappelletti, M., Fedi, S., Zampolli, J., Di Canito, A., D’Ursi, P., Orro, A., ... Di Gennaro, P. (2016).

- Phenotype microarray analysis may unravel genetic determinants of the stress response by *Rhodococcus aetherivorans* BCP1 and *Rhodococcus opacus* R7. *Research in Microbiology*, 167(9–10), 766–773.
- Cerniglia, C. E. (1993). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, 4(3), 331–338.
- Chávez, F. P., Lünsdorf, H., & Jerez, C. A. (2004). Growth of polychlorinated-biphenyl-degrading bacteria in the presence of biphenyl and chlorobiphenyls generates oxidative stress and massive accumulation of inorganic polyphosphate. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(5), 3064–3072.
- Csonka, L. N. (1989). Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiological Reviews*, Vol. 53, pp. 121–147.
- Dai, J., Dai, W., Qiu, C., Yang, Z., Zhang, Y., Zhou, M., ... Chen, X. (2015). Unraveling adaptation of *Pontibacter korlensis* to radiation and infertility in desert through complete genome and comparative transcriptomic analysis. *Scientific Reports*, 5(1), 1–9.
- De Carvalho, C. C. C. R. (2010). *Adaptation of Rhodococcus to Organic Solvents*.
- De Oliveira, V. M., Sette, L. D., Simioni, K. C. M., & Neto, E. V. D. S. (2008). Bacterial diversity characterization in petroleum samples from Brazilian reservoirs. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(3), 445–452.
- Dougan, D. A., Mogk, A., & Bukau, B. (2002). Protein folding and degradation in bacteria: To degrade or not to degrade? That is the question. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol. 59, pp. 1607–1616.
- Edwards, C. (1990). *Microbiology of extreme environments*.
- Ehira, S., Teramoto, H., Inui, M., & Yukawa, H. (2009). Regulation of *Corynebacterium glutamicum* heat shock response by the extracytoplasmic-function sigma factor SigH and transcriptional regulators HspR and HrcA. *Journal of Bacteriology*, 191(9), 2964–2972.
- Ekpanyaskun, P. (2006). Transcriptomic analysis of *Rhodococcus* sp. RHA1 responses to heat shock and osmotic stress. *M.Sc.*
- Fredrickson, J. K., Li, S. M. W., Gaidamakova, E. K., Matrosova, V. Y., Zhai, M., Sulloway, H. M., ... Daly, M. J. (2008). Protein oxidation: Key to bacterial desiccation resistance? *ISME Journal*, 2(4), 393–403.
- Gerday, C., & Glansdorff, N. (2007). Physiology and biochemistry of extremophiles. *Physiology and Biochemistry of Extremophiles*.
- Gilichinsky, D., Rivkina, E., Bakermans, C., Shcherbakova, V., Petrovskaya, L., Ozerskaya, S., ... Tiedje, J. M. (2005). Biodiversity of cryopegs in permafrost. *FEMS Microbiology Ecology*, 53(1), 117–128.
- Goordial, J., Raymond-Bouchard, I., Zolotarov, Y., de Bethencourt, L., Ronholm, J., Shapiro, N., ... Whyte, L. (2016). Cold adaptive traits revealed by comparative genomic analysis of the eurypsychrophile *Rhodococcus* sp. JG3 isolated from high elevation McMurdo Dry Valley permafrost, Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(2), 1–11.
- Gruber, T. M., & Gross, C. A. (2003). Multiple Sigma Subunits and the Partitioning of Bacterial Transcription Space. *Annual Review of Microbiology*, 57(1), 441–466.
- Gupta, S., & Chatterji, D. (2005). Stress Responses in *Mycobacteria*. *IUBMB Life (International Union*

of Biochemistry and Molecular Biology: Life), 57(3), 149–159.

- Gutiérrez, T., Learmonth, R. P., Nichols, P. D., & Couperwhite, I. (2003). Comparative benzene-induced fatty acid changes in a *Rhodococcus* species and its benzene-sensitive mutant: Possible role of myristic and oleic acids in tolerance. *Journal of Chemical Ecology*, 29(10), 2369–2378.
- Hansch, C., McKarns, S. C., Smith, C. J., & Doolittle, D. J. (2000). Comparative QSAR evidence for a free-radical mechanism of phenol-induced toxicity. *Chemico-Biological Interactions*, 127(1), 61–72.
- Helmann, J. D. (2002). The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Advances in Microbial Physiology*, Vol. 46, pp. 47–110.
- Hill, C., O'Driscoll, B., & Booth, I. (1995). Acid adaptation and food poisoning microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 28(2), 245–254.
- Iwasaki, T., Miyauchi, K., Masai, E., & Fukuda, M. (2006). Multiple-subunit genes of the aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase play an active role in biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation in *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8), 5396–5402.
- Jiang, W., Hou, Y., & Inouye, M. (1997). CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. *Journal of Biological Chemistry*, 272(1), 196–202.
- Kanamori, T., Kanou, N., Atomi, H., & Imanaka, T. (2004). Enzymatic characterization of a Prokaryotic urea carboxylase. *Journal of Bacteriology*, 186(9), 2532–2539.
- Kolomytseva, M. P., Solyanikova, I. P., Golovlev, E. L., & Golovleva, L. A. (2005). Heterogeneity of *Rhodococcus opacus* 1CP as a response to stress induced by chlorophenols. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41(5), 474–479.
- Krulwich, T. A., Sachs, G., & Padan, E. (2011). Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis. *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 9, pp. 330–343.
- Kuang, S., Fan, X., & Peng, R. (2018). Quantitative proteomic analysis of *Rhodococcus ruber* responsive to organic solvents. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32(6), 1418–1430.
- Larkin, M. J., Kulakov, L. A., & Allen, C. C. R. (2005). Biodegradation and *Rhodococcus* - Masters of catabolic versatility. *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 16, pp. 282–290.
- Larkin, M. J., Kulakov, L. A., & Allen, C. C. R. (2006). Biodegradation by members of the genus *Rhodococcus*: Biochemistry, Physiology, and Genetic Adaptation. *Advances in Applied Microbiology*, Vol. 59, pp. 1–29.
- LeBlanc, J. C., Gonçalves, E. R., & Mohn, W. W. (2008). Global response to desiccation stress in the soil actinomycete *Rhodococcus jostii* RHA1. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(9), 2627–2636.
- Lebre, P. H., De Maayer, P., & Cowan, D. A. (2017). Xerotolerant bacteria: Surviving through a dry spell. *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 15, pp. 285–296.
- Lijinsky, W. (1991). The formation and occurrence of polynuclear aromatic hydrocarbons associated with food. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 259(3–4), 251–261.
- Liu, W. T., Karavolos, M. H., Bulmer, D. M., Allaoui, A., Hormaeche, R. D. C. E., Lee, J. J., & Anjam Khan, C. M. (2007). Role of the universal stress protein UspA of *Salmonella* in growth arrest, stress and virulence. *Microbial Pathogenesis*, 42(1), 2–10.

- Liu, Z., He, Z., Huang, H., Ran, X., Oluwafunmilayo, A. O., & Lu, Z. (2017). pH Stress-Induced Cooperation between *Rhodococcus ruber* YYL and *Bacillus cereus* MLY1 in Biodegradation of Tetrahydrofuran. *Frontiers in Microbiology*, 8(NOV), 2297.
- Martínková, L., Uhnáková, B., Pátek, M., Nešvera, J., & Křen, V. (2009). Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Environment International*, Vol. 35, pp. 162–177.
- Maugeri, T. L., Gugliandolo, C., Caccamo, D., & Stackebrandt, E. (2001). A polyphasic taxonomic study of thermophilic bacilli from shallow, marine vents. *Systematic and Applied Microbiology*, 24(4), 572–587.
- McLeod, M. P., Warren, R. L., Hsiao, W. W. L., Araki, N., Myhre, M., Fernandes, C., ... Eltis, L. D. (2006). The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(42), 15582–15587.
- Michałowicz, J., & Duda, W. (2007). Phenols - Sources and toxicity. *Polish Journal of Environmental Studies*, Vol. 16, pp. 347–362.
- Michałowicz, Jaromir, & Duda, R. O. W. (2005). Analysis of chlorophenols, chlorocatechols, chlorinated methoxyphenols and monoterpenes in communal sewage of Łódź and in the Ner River in 1999-2000. *Water, Air, and Soil Pollution*, 164(1–4), 205–222.
- Missiakas, D., & Raina, S. (1998). The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation. *Molecular Microbiology*, 28(6), 1059–1066.
- Möker, N., Bocker, M., Schaffer, S., Krämer, R., Morbach, S., & Bott, M. (2004). Deletion of the genes encoding the MtrA-MtrB two-component system of *Corynebacterium glutamicum* has a strong influence on cell morphology, antibiotics susceptibility and expression of genes involved in osmoprotection. *Molecular Microbiology*, 54(2), 420–438.
- Moriya, K., & Horikoshi, K. (1993). Isolation of a benzene-tolerant bacterium and its hydrocarbon degradation. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 76(3), 168–173.
- Moyer, C. L., Dobbs, F. C., & Karl, D. M. (1995). Phylogenetic diversity of the bacterial community from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi seamount, Hawaii. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4), 1555–1562.
- Muffler, A., Bettermann, S., Haushalter, M., Hörlein, A., Neveling, U., Schramm, M., & Sorgenfrei, O. (2002). Genome-wide transcription profiling of *Corynebacterium glutamicum* after heat shock and during growth on acetate and glucose. *Journal of Biotechnology*, 98(2–3), 255–268.
- Ohtsubo, Y., Kudo, T., Tsuda, M., & Nagata, Y. (2004). Strategies for bioremediation of polychlorinated biphenyls. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 65, pp. 250–258.
- Patrauchan, M. A., Florizone, C., Eapen, S., Gómez-Gil, L., Sethuraman, B., Fukuda, M., ... Eltis, L. D. (2008). Roles of ring-hydroxylating dioxygenases in styrene and benzene catabolism in *Rhodococcus jostii* RHA1. *Journal of Bacteriology*, 190(1), 37–47.
- Potts, M. (2001). Desiccation tolerance: A simple process? *Trends in Microbiology*, Vol. 9, pp. 553–559.
- Puglisi, E., Cahill, M. J., Lessard, P. A., Capri, E., Sinskey, A. J., Archer, J. A. C., & Boccuzzi, P. (2010). Transcriptional Response of *Rhodococcus aetherivorans* I24 to Polychlorinated Biphenyl-Contaminated Sediments. *Microbial Ecology*, 60(3), 505–515.
- Qiao, J., Wang, J., Chen, L., Tian, X., Huang, S., Ren, X., & Zhang, W. (2012). Quantitative iTRAQ LC-MS/MS proteomics reveals metabolic responses to biofuel ethanol in cyanobacterial

- synechocystis sp. PCC 6803. *Journal of Proteome Research*, 11(11), 5286–5300.
- Raymond-Bouchard, I., Tremblay, J., Altshuler, I., Greer, C. W., & Whyte, L. G. (2018). Comparative transcriptomics of cold growth and adaptive features of a eury- and steno-psychrophile. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1565.
- Roberson, E. B., & Firestone, M. K. (1992). Relationship between desiccation and exopolysaccharide production in a soil *Pseudomonas* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(4), 1284–1291.
- Rothschild, L. J., & Mancinelli, R. L. (2001). Life in extreme environments. *Nature*, Vol. 409, pp. 1092–1101.
- Röttig, A., Hauschild, P., Madkour, M. H., Al-Ansari, A. M., Almakishah, N. H., & Steinbüchel, A. (2016). Analysis and optimization of triacylglycerol synthesis in novel oleaginous *Rhodococcus* and *Streptomyces* strains isolated from desert soil. *Journal of Biotechnology*, 225, 48–56.
- Russell, N. J. (1990). Cold adaptation of microorganisms. *Philosophical Transactions - Royal Society of London, B*, 326(1237), 595–611.
- Sazykin, I., Makarenko, M., Khmelevtsova, L., Seliverstova, E., Rakin, A., & Sazykina, M. (2019). Cyclohexane, naphthalene, and diesel fuel increase oxidative stress, *cyp153*, *sodA*, and *recA* gene expression in *Rhodococcus erythropolis*. *MicrobiologyOpen*, 8(9).
- Siegrist, R. L. (1991). Volatile organic compounds in contaminated soils: The nature and validity of the measurement process. *Journal of Hazardous Materials*, 29(1), 3–15.
- Sikkema, J., De Bont, J. A. M., & Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews*, Vol. 59, pp. 201–222.
- Sikkema, Jan, De Bont, J. A. M., & Poolman, B. (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 269(11), 8022–8028.
- Slonczewski, J. L., Fujisawa, M., Dopson, M., & Krulwich, T. A. (2009). Cytoplasmic pH measurement and homeostasis in *Bacteria* and *Archaea*. *Advances in Microbial Physiology*, Vol. 55, pp. 1–317.
- Song, X., Xu, Y., Li, G., Zhang, Y., Huang, T., & Hu, Z. (2011). Isolation, characterization of *Rhodococcus* sp. P14 capable of degrading high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons and aliphatic hydrocarbons. *Marine Pollution Bulletin*, 62(10), 2122–2128.
- Stevenson, A., Cray, J. A., Williams, J. P., Santos, R., Sahay, R., Neuenkirchen, N., ... Hallsworth, J. E. (2015). Is there a common water-activity limit for the three domains of life. *ISME Journal*, 9(6), 1333–1351.
- Swarts, H. J., Verhagen, F. J. M., Field, J. A., & Wijnberg, J. B. P. A. (1998). Trichlorinated phenols from *Hypholoma elongatum*. *Phytochemistry*, 49(1), 203–206.
- Takacs, C. D., Ehringer, M., Favre, R., Cermola, M., Eggertsson, G., Palsdottir, A., & Reysenbach, A.-L. (2001). Phylogenetic characterization of the blue filamentous bacterial community from an Icelandic geothermal spring. *FEMS Microbiology Ecology*, 35(2), 123–128.
- Tsvetkova, N. M., Horváth, I., Török, Z., Wolkers, W. F., Balogi, Z., Shigapova, N., ... Vigh, L. (2002). Small heat-shock proteins regulate membrane lipid polymorphism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(21), 13504–13509.
- Van Vliet, A. H. M., Kuipers, E. J., Stoof, J., Poppelaars, S. W., & Kusters, J. G. (2004). Acid-responsive gene induction of ammonia-producing enzymes in *Helicobacter pylori* is mediated via a metal-responsive repressor cascade. *Infection and Immunity*, 72(2), 766–773.

- Ventura, M., Canchaya, C., Zhang, Z., Bernini, V., Fitzgerald, G. F., & Van Sinderen, D. (2006). How high G+C Gram-positive bacteria and in particular bifidobacteria cope with heat stress: Protein players and regulators. *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 30, pp. 734–759.
- Verón, S. R., Paruelo, J. M., & Oesterheld, M. (2006). Assessing desertification. *Journal of Arid Environments*, 66(4), 751–763.
- Wang, H., Yang, Y., Xu, J., Kong, D., & Li, Y. (2019). iTRAQ-based comparative proteomic analysis of differentially expressed proteins in *Rhodococcus* sp. BAP-1 induced by fluoranthene. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 169, 282–291.
- Wang, M., Chen, J., Yu, H., & Shen, Z. (2018). Improving stress tolerance and cell integrity of *Rhodococcus ruber* by overexpressing small-shock-protein Hsp16 of *Rhodococcus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 45(10), 929–938.
- Warhurst, A. M., & Fewson, C. A. (1994). Biotransformations catalyzed by the genus *Rhodococcus*. *Critical Reviews in Biotechnology*, 14(1), 29–73.
- Wickner, S., Maurizi, M. R., & Gottesman, S. (1999). Posttranslational quality control: Folding, refolding, and degrading proteins. *Science*, Vol. 286, pp. 1888–1893.
- Yoneda, A., Henson, W. R., Goldner, N. K., Park, K. J., Forsberg, K. J., Kim, S. J., ... Moon, T. S. (2016). Comparative transcriptomics elucidates adaptive phenol tolerance and utilization in lipid-accumulating *Rhodococcus opacus* PD630. *Nucleic Acids Research*, 44(5), 2240–2254.